





Daftar isi

1. Daftar isi	i
2. Prakata	ii
3. Ruang lingkup	1
4. Acuan normatif.....	1
5. Istilah dan definisi	1
6. Syarat mutu	2
7. Pengambilan contoh	3
8. Cara uji	3
9. Higiene	4
10. Pengemasan	4
11. Syarat penandaan	5
Lampiran A : Cara uji asam butirat dalam lemak	6
Lampiran B : Cara uji vitamin A	9
Lampiran C : Cara uji Vitamin D	12

Prakata

Penyusunan Standar Nasional Indonesia (SNI) Margarin ini merupakan revisi SNI 01-3541-1994 *Margarin* disiapkan oleh Tim Panitia Teknis Makanan dan Minuman, Departemen Perindustrian dan Perdagangan.

Adapun tujuan revisi ini dibuat adalah sebagai acuan sehingga produk margarin yang beredar di Indonesia dapat terjamin mutu dan keamanannya bagi konsumen. Selain itu guna mengakomodir cara uji yang mengacu pada standar internasional dan perkembangan permintaan pasar yang cepat.

Tim di atas dalam menyusun Rancangan SNI ini telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam :

1. Permenkes RI No. 722/Menkes/PER/IX/88 : Bahan Tambahan Makanan
2. Kepmenkes RI No. 23/Menkes/SK/I/78 : Pedoman Cara Produksi yang Baik untuk Makanan.

Standar ini sudah dibahas oleh rapat teknis di Jakarta tanggal 7 September 2001 dan prokonsensus tanggal 21 September 2001 dan terakhir dibahas dalam Rapat Konsensus Nasional pada tanggal 14 Nopember 2001 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil-wakil dari konsumen, produsen, Lembaga Litbang, Lembaga IPTEK, asosiasi serta instansi terkait lainnya.



Margarin

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan acuan, istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, cara uji, hygiene, pengemasan dan syarat penandaan untuk produk emulsi berbentuk semi padat dan cair, dengan kandungan lemaknya tidak kurang dari 62% dan tidak lebih dari 90%, dan penggunaan utamanya adalah sebagai margarin.

Standar ini tidak berlaku bagi mentega.

2 Acuan normatif

SNI 19 - 0428 - 1998, *Petunjuk pengambilan contoh padat*

SNI 01 - 3555 - 1998, *Cara uji minyak dan lemak*

SNI 01 - 2896 - 1998, *Cara uji cemaran logam dalam makanan*

SNI 01 2897- 1992, *Cara uji cemaran mikroba*

SNI 01 - 4866 - 1998, *Cara uji cemaran arsen dalam makanan*

AOCS The American Oil Chemist Society, 1998 Official Methods and recommended Practices of the AOCS 5th ed. AOCS Press Washington, DC Ca 5c-87(1989)

3 Istilah dan definisi

3.1

margarin

produk makanan berbentuk emulsi (w/o), baik semipadat maupun cair, yang dibuat dari lemak makan dan atau minyak makan nabati, dengan atau tanpa perubahan kimiawi termasuk hidrogenasi, interesterifikasi, dan telah melalui proses pemurnian, sebagai bahan utama serta mengandung air dan bahan tambahan pangan yang diizinkan.

CATATAN Bila diperlukan, margarin dapat pula mengandung lemak susu yang kandungannya maximum 3% dari total lemak

3.2

margarin siap makan

margarin meja dan margarin oles yang ditujukan untuk langsung dimakan, tanpa diolah terlebih dahulu, dan dikemas

CATATAN margarin ini harus ditambahkan vitamin yang dipersyaratkan, yang jumlahnya sesuai dengan peraturan yang ditetapkan

3.3

margarin industri

margarin yang digunakan sebagai bahan baku untuk produksi makanan lainnya

CATATAN Margarin ini tidak perlu ditambahkan vitamin

3.4

margarin krim atau spread

margarin dengan kandungan lemak total : 62% - 78%

3 Syarat mutu

Tabel 1 Syarat mutu margarin

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan		
			Margarin siap makan	Margarin industri	Margarin krim atau spread
1	Keadaan 1.1 Bau 1.2 Warna 1.3 Rasa		dapat diterima. dapat diterima dapat diterima		
2	Air	% b/b	maks 18	maks 18	-
3	Lemak	% b/b	min 80	min 80	62 – 78
4	Vitamin A	IU/100 g	2500 – 3500	-	-
5	Vitamin D	IU/100 g	250 – 350	-	-
6	Asam butirat*	%b/b	maks. 0,2*	maks. 0,2*	maks. 0,2*
7	Bilangan asam	mg KOH/g	maks 4	maks 4	maks 4
8	Bahan tambahan pangan		Sesuai peraturan yang berlaku		
9	Cemaran logam				
9.1	Timbal (Pb)	mg / kg	0,1	0,1	0,1
9.2	Timah (Sn)	mg / kg	maks. 40,0/250**	maks. 40,0/250**	maks. 40,0/250**
9.3	Raksa (Hg)	mg / kg	maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03
10	Cemaran arsen Arsen (As)	mg / kg	0,1	0,1	0,1
11	Cemaran mikroba				
11.1	Angka Lempeng Total	Koloni/g	Maks 10 ⁵	maks 10 ⁵	maks 10 ⁵
11.2	Bakteri bentuk Coli	APM/g	maks 10	maks 10	maks 10
11.3	<i>E. Coli</i>	APM/g	< 3	< 3	< 3
11.4	<i>S. aureus</i>	Koloni/g	Maks 10 ²	maks 10 ²	maks 10 ²
11.5	<i>Salmonella</i>	Koloni/25 g	negatif	negatif	negatif
11.6	<i>Enterococci</i>	Koloni/g	Maks 10 ²	maks 10 ²	maks 10 ²
*) untuk margarin yang mengandung lemak susu					
**) dalam kemasan kaleng					

5 Pengambilari contoh

Sesuai dengan SNI 19-0428-1998, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*

6 Cara uji

6.1 Keadaan

Bau, rasa, dan warna sesuai SNI 01 - 2891 - 1992. *Cara uji makanan dan minuman*, butir 1.2

6.2 Kadar air

Sesuai SNI 01 - 2891 - 1992, *Cara uji makanan dan minuman*, butir 5.1

6.3 Lemak

Sesuai SNI 01 - 2891 - 1992, *Cara uji makanan dan minuman*, butir 8.3

6.4 Bilangan asam

Sesuai SNI 01 -- 3555 - 1998, *Cara uji minyak dan lemak*, butir 8

6.5 Asam Butirat

Sesuai cara uji kandungan asam butirat dalam lemak (Lampiran A)

6.6 Vitamin A

Sesuai cara uji vitamin A (lampiran B)

6.7 Vitamin D

Sesuai Cara Uji Vitamin D (Lampiran C)

6.8 Cara uji cemaran logam

6.8.1 Timbal (Pb)

Sesuai SNI 01 - 2896 - 1998, *Cara uji cemaran logam dalam makanan*

6.8.2 Timah (Sn)

Sesuai SNI 01 - 2896 - 1998, *Cara uji cemaran logam dalam makanan*

6.8.3 Raksa (Hg)

Sesuai SNI 01 – 2896 - 1998, *Cara uji cemaran logam dalam makanan*

6.9 Cemaran Arsen (As)

Sesuai SNI 01 – 4866 - 1998, *Cara uji cemaran arsen dalam makanan*

6.10 Cemarkan Mikrobi

Sesuai SNI 19 -2897 - 1992, *Cara uji cemarkan mikrobi*

7 Higiene

Produk yang bertanda SNI ini, harus dipersiapkan/diproses dan penanganannya mengacu pada peraturan Departemen Kesehatan RI yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi yang Baik untuk Makanan

8 Pengemasan

Margarin dikemas dalam wadah yang tertutup rapat. Kemasan tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, sehingga produk tetap baik selama penyimpanan dan pengangkutan.

9 Syarat penandaan

9.1 Label

Produk harus dilabel sesuai PP No. 69/1999 tentang label dan iklan pangan,

9.2 Cara pemberian nama

Bila suatu produk margarin ditujukan untuk penggunaan khusus dan atau mempunyai karakteristik yang spesifik, maka kata yang menggambarkan keterangan penggunaan atau karakteristik tersebut dapat dijadikan kata keterangan dan diletakkan di belakang kata margarin.

CONTOH:

Margarin kue adalah margarin yang digunakan untuk membuat kue.

Margarin biskuit adalah margarin untuk membuat biskuit,

Margarin *pastry* (lipat) adalah margarin yang digunakan untuk membuat *pastry*.

Margarin dapur adalah margarin untuk masak.

Margarin oles adalah margarin untuk dioles.

Margarin putih adalah margarin tanpa penambahan bahan pewarna.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji kandungan asam butirat dalam lemak

A.1 Definisi

Asam butirat dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya lemak susu dalam suatu produk lemak.

A.2 Ruang lingkup

Metode ini dapat dipakai untuk menentukan kandungan lemak susu dalam margarine, yang jumlahnya dinyatakan sebagai persentasi asam butirat dalam komposisi asam lemak dari suatu produk.

A.3 Peralatan

- a). Kromatografi gas dengan FID Detektor dan Integrator elektronik
- b). Kolom : Chromosorb W, panjang 2 m dan diameter dalam 3 mm, glass .
- c). *Syringe* 1 μ l (5 μ l atau 10 μ l).
- d). Gelas piala 50 ml.
- e). Tabung reaksi 10 ml bertutup asah.
- f). Pipet ukur 2 ml sampai 5 ml.
- g). Kertas saring.
- h). butiran-butiran kaca.
- ii). Kaca arloji.
- j). Penangas air.

A.4 Bahan pereaksi kimia

Aquadest untuk kromatografi.

Air yang digunakan untuk analisa adalah air kromatografi.

KOH 0,5 N dalam etanol.

Larutan asam orthophosphat 5% b/v dalam air.

Larutan standar asam n — butirat : 0,4 mg / ml dalam air.

Larutan standar internal asam n — valerat : 0,25 mg / ml dalam air.

A.5 Kondisi operasi kromatografi gas

Kondisikan kolom sebelum dipakai pada suhu 180 °C selama minimum 48 jam.

Suhu Injektor : 175 °C.

Suhu Detektor	: 25 – 50 °C di atas suhu analisa.
Suhu Oven	: 130 — 135 °C.
Waktu rambat (<i>Retention time</i>)	: kurang lebih 5 menit.
Gas pembawa (<i>Carrier gas</i>)	: Helium, Nitrogen, dengan kemurnian 99.95%.

A.6 Cara kerja

A.6.1 Kurva kalibrasi

A.6.1.1 Buat larutan deret standar dalam tabung reaksi yang mengandung 0,08 mg; 0,2 mg; 0,4 mg; 0,8 mg; 1,4 mg dan 2,0 mg asam butirat dan 0,5 mg asam valerat dengan cara sebagai berikut: Masukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi : 0,2 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml; 3,5 ml dan 5,0 ml larutan standar asam butirat, kemudian tambahkan larutan asam valerat ke dalam masing-masing tabung reaksi tersebut sebanyak 2,0 ml, setelah itu tambahkan air secara berurutan 4,8 ml; 4,5 ml; 4,0 ml; 3,0 ml; 1,5 ml dan 0 ml air.

Tutup tabung reaksi dan kocok sampai larutan tercampur rata.

A.6.1.2 Stabilkan kolom KG sekurang-kurangnya 30 menit pada suhu analisa

A.6.1.3 Injeksikan secara bergiliran 1 µl larutan standar yang telah dipersiapkan (butir A.6.1.1)

A.6.1.4 Ukur tinggi puncak kromatogram (*peak*) asam butirat dan asam valerat dengan ketelitian 0,5 mm

A.6.1.5. Hitung rasio tinggi puncak (asam butirat / asam valerat) untuk setiap standar dan buat kurva hubungan antara ratio tinggi puncak dengan berat asam butirat yang terkait.

A.6.2 Penetapan kandungan asam butirat

A.6.2.1 Tirnbang contoh dengan teliti kurang lebih 100 mg ke dalam piala gelas , tambahkan 3 ml larutan KOH 0,5 N dalam ethanol dan beberapa butir batu didih. Tutup gelas piala dengan kaca arloji dan letakkan dalam penangas air yang mendidih kirakira 10 menit atau sampai tidak kelihatan lagi butiran lemak di permukaan.

Angkat kaca arloji dan lanjutkan pemanasan sampai seluruh etanol menguap. Angkat gelas piala dan diamkan sampai dingin.

A.6.2.2 Tambahkan 5 ml air

A.6.2.3 Tutup dengan kaca arloji dan goyangkan perlahan-lahan sampai semua sabunnya larut (dapat dibantu dengan pemanasan).

A.6.2.4 Tambahkan larutan asam orthophosphat 5,0 ml, goyangkan sedikit untuk mengengkoagulasi asam lemak yang mengendap.

A.6.2.5 Saring dengan kertas saring lipat

A.6.2.6 Ambil dan pindahkan filtrat sebanyak 5,0 ml ke dalam tabung reaksi dan tambahkan ke dalamnya 2,0 ml larutan standar internal asam valerat. Tutup dan

homogenkan .

A.6.2.7 Stabilkan kolom kurang lebih 30 menit pada suhu analisa.

A.6.2.8 Injeksikan 1 µl larutan contoh tadi ke dalam KG.

A.7 Perhitungan

Hitung rasio tinggi puncak kromatogram asam butirat / asam valerat yang diperoleh dari analisa contoh dan hitung kandungan asam butirat berdasarkan kurva standar yang didapat

Kandungan asam butirat dinyatakan sebagai persentasi (b/v) sebagai berikut :

$$\frac{W(b) \times 100}{W(s)}$$

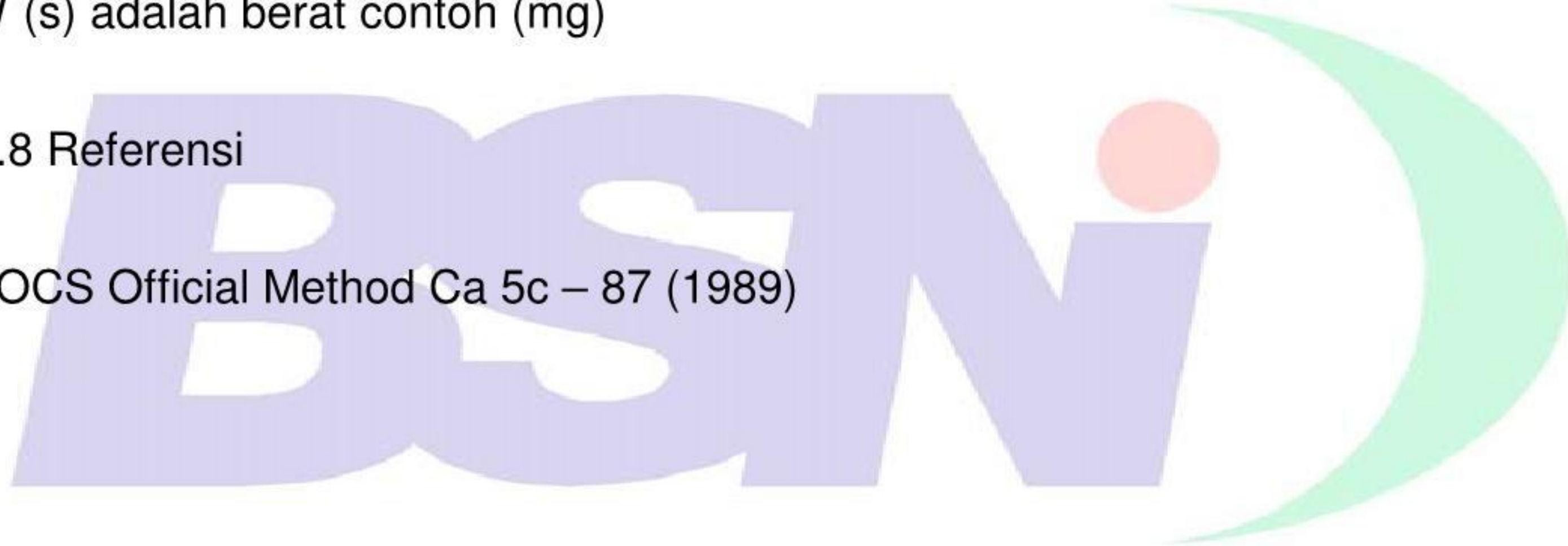
dengan pengertian :

W (b) adalah berat asam butirat (mg) yang dibaca dari kurva standar

W (s) adalah berat contoh (mg)

A.8 Referensi

AOCS Official Method Ca 5c – 87 (1989)



Lampiran B (normatif) Cara uji vitamin A

B.1 Prinsip

Lemak atau margarin dilarutkan dalam isopropanol / chloroform dan di analisa dengan khromatografi kinerja tinggi (HPLC) menggunakan detektor UV. Peak yang diperoleh untuk vitamin A asetat dihitung dengan membandingkannya dengan standar eksternal.

B.2 Pereaksi

Pereaksi yang digunakan harus yang berkualitas atau HPLC grade (lihat butir B.8a) :

Propanol – 2 (Iso propanol)

Chloroform

Metanol

Standar vitamin A asetat yang kepekataannya diketahui (lihat butir B. 8b).

B.3 Peralatan

Gelas piala 25 ml

Labu ukur 25 ml, 100 ml

Seperangkat HPLC

Seperangkat alat penyaring, seperti : Millex SR, penangas air, oven dengan thermostat, neraca dan lain – lain.

B.4 Kondisi HPLC

Kolom	: Li chrosorb RP 18,5 urn, 150 x 4,6 mm kolom baja (lihat butir 8 c)
Detektor	: UV
Panjang gelombang	: 325 nm
Kepekaan detektor	: 0,02 AUFS (lihat butir 8 f)
Campuran solven	: lihat butir 8 a
Solven 1	: Proponal-2 : chloroform 85 : 15 (untuk melarutkan contoh)
HPLC eluen	: metanol : chloroform 97,5 : 2,5 (untuk standar vitamin A)
Kecepatan alir eluen	: 1,0 ml / menit
Volume injeksi	: 20 µl

B.5 Kalibrasi standar

Siapkan larutan stock 10 mg vitamin A asetat dalam 100 ml propanol-2 yang sudah dihilangkan gasnya (lihat butir B.8a), sebaiknya dengan mengencerkan dari larutan yang lebih pekat (mis. 100 mg / 50 mg). Sebelum dianalisis, encerkan 1 ml larutan stock ke dalam 100 ml solvent 1 (propanol-2: Chloroform = 85:15). Gunakan larutan ini untuk mengkalibrasi HPLC (lihat butir B.8 b).

B.6 Cara kerja

a. Persiapan contoh

Timbang dengan teliti 1,5 – 2,0 g contoh ke dalam piala 25 ml. Tambahkan +/-sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC (lihat butir B.8 e).

b. Pencucian / Recondition. Cucilah kolom dengan alat HPLC dengan memompa eluen yang sesuai untuk kira-kira 1-2 jam sebelum analisis. Pada selang waktu tertentu, injeksikan larutan pengkalibrasi untuk meyakinkan bahwa retensi waktunya stabil dan hasilnya jelas terlihat.

c. Kalibrasi

Buatlah kurva kalibrasi dengan cara yang biasa

d. Analisis

Injek 20 µl larutan contoh. Ukur area peak zat yang ditetapkan dalam contoh. Untuk campuran induk dan larutan konsentrat yang lain, larutan contoh harus diencerkan dengan sesuai sebelum dianalisis. Disarankan untuk mencuci kolom HPLC dengan mempercepat kecepatan alir antara injeksi contoh.

B.7 Perhitungan

Faktor kalibrasi

$$F = \frac{\text{Luas puncak}}{\text{Jumlah}} = \frac{A_s}{M_s}$$

Perhitungan kandungan vitamin A asetat

$$C = \frac{A}{FW} \times D = \frac{A}{A_s} \times \frac{M_s}{W} \times D$$

Dengan pengertian :

F adalah faktor kalibrasi

As adalah merupakan peak area dari standar yang sesuai dalam kromatogram kalibrasi (lihat butir B. 8g)

Ms adalah jumlah standar yang diinjeksikan (lihat butir B: 8 g)

C adalah kandungan vitamin A asetat dalam contoh (lihat butir B. 8 g)

A adalah merupakan luas puncak vitamin A asetat dalam kromatogram contoh (lihat butir

- B. 8 g)
- C adalah kandungan vitamin A asetat dalam contoh (lihat butir B. 8 g)
- A adalah merupakan luas puncak vitamin A asetat dalam kromatogram contoh (lihat butir B. 8 g)
- W adalah bobot contoh dalam gram
- D adalah faktor pengenceran

B.8 Catatan

- Semua solven dan campuran solven sebelum digunakan harus dihilangkan gasnya, untuk menghindari kehilangan vitamin A dan menjamin kelayakan kemampuan pompa HPLC. Cara menghilangkan gas dapat dilakukan seperti dijelaskan dalam manual alat HPLC atau dengan meniupkan helium melalui solven, atau dengan memanaskan sebentar di bawah titik didih dengan reflux kondenser. Solven harus transparan dalam UV pada 325 nm.
- Jika konsentrasi standar vitamin A yang digunakan tidak diketahui, standar tersebut harus ditetapkan dengan UV spektrofotometri, dan kemurniannya dicek dengan HPLC (hanya satu peak harus diperoleh pada 325 nm ketika menggunakan cara reversed – phase HPLC).
- Umurnya kolom C18 reversed phase akan bekerja dengan baik. Tapi perlu penyesuaian ratio campuran eluen HPLC (metanol : chloroform) untuk memperoleh peak yang dapat digunakan.
- Pemanasan sebentar pada penangas air, mengocok dengan pengaduk, jika perlu pemanasan harus minimal dan larutan hanya hangat (+/- 30 °C).
- Untuk menyaring, gunakan peralatan penyaring biasa yang cocok untuk menyaring yang partikelnya di atas 1 µm. Sebagai alternatif, dapat digunakan Mixel Sr 0,5 urn (tekan 1-2 ml larutan contoh melalui penyaring memakai syringe 2 ml, buang 200 – 500 ml pertama, injek larutan saringan yang berikutnya).
- Harus digunakan variable, panjang gelombang detektor UV yang sensitif, memberikan signal yang baik untuk noise rasio pada 0,02 av a.u.f.s (a.u.f.s. = unit serapan pada skala penuh). Berapa model yang kuno mungkin tidak cukup sensitif.
- Luas puncak dan jumlah vitamin dapat diukur atau dihitung dalam unit yang sesuai, misalnya peak area dalam mm², cm², uv detik atau pembacaan planmeter dan jumlah dalam µg ester vitamin A bebas atau dalam internasional unit (IU). Buatlah bahwa unit-unit yang sama digunakan melalui prosedur untuk kalibrasi dan analisis.

Lampiran C (normatif) Cara uji vitamin D

C.1 Prinsip

Penyabunan contoh pada suhu ruang dan recovery fraksi kandungan vitamin D dari bahan yang tidak tersabunkan menggunakan teknik RP. Pemisahan penyerapan kromatografi fraksi ini untuk penetapan kualitatif dan kuantitatif vitamin D. Identifikasinya dibuat dengan membandingkan retensi waktu relatif dengan standar.

C.2 Pereaksi dan bahan-bahan

- a. Vitamin D3 (ergocalciferol 50-14-6) atau vitamin D3 (67-97-0). Harus digunakan standar yang murni dengan diketahui jumlahnya.

Perhatian :

Ergocalciferol (vitamin D2) dan vitamin D3 adalah sangat beracun bila dihisap, kena kulit atau ditelan. Ada kemungkinan akibat pengaruhnya. Jika merasa kurang enak badan, temuilah dokter (tunjukkan labelnya jika mungkin). Pakai pakaian pelindung yang sesuai, sarung tangan dan pelindung mata / muka jangan menghisap debu.

- b. Pyrogallol (87-66-1)

Perhatian : Pyrogallol berbahaya bila dihisap, mengenai kulit dan jika ditelan

- c. Etanol 96%
- d. Larutan KOH jenuh
- e. Metanol untuk chromatografi
- f. Dietil eter, bebas peroksida
- g. 1,4 – dioxane, untuk khromatografi
- h. n-heksana, untuk khromatografi
- i. Nitrogen 99,99%
- j. Natrium sulfat, bebas air
- k. Alumunium Foil
- l. Eluen 1: Air dalam metanol Q = 8 ml / l
- m. Eluen 2: 1,4 – dioxane dalam n – heksan Q = 75 ml

C.3 Peralatan

- a. Neraca analitik.
- b. Erlenmeyer berwarna coklat 200 ml.
- c. Gelas ukur 10 ml, 50 ml, 250 ml dan 500 ml.
- d. Corong pemisah / labu kocok berwarna coklat 250 ml.

- e. Labu berdasar bulat coklat 250 ml
- f. Corong 0,8 cm.
- g. Rotary evaporator.
- h. Fluted filter, water repellent.
- i. Penyaring vacuum micro 2 ml, pori-pori 0,3 dengan benang penghubung.
- j. Labu berbentuk lancip coklat 10 ml, dengan sambungan bawah.
- k. Labu ukur coklat 1 ml, 2 ml, 5 ml dan 100 ml.
- l. Kombinasi seperangkat HPLC dengan detector UV.
- m. Rekorder / alat pencatat.
- n. Sistem integrator.
- o. Kolom RP-18,5 μm , 250mm x 4,6 mm dengan 2 cm pre kolom RP-18.
- p. Kolom : Si 60,5 μm , 125 mm x 4.6 mm.
- q. Feeding system 100 μl – 2000 μl .
- r. Mesin pengocok atau magnetic stirrer
- s. Alat pendingin untuk $+1/-0$ $^{\circ}\text{C}$
- t. Pompa vacuum
- u. Pipet ukur 5 ml
- v. Syringes 10 μl – 2000 μl atau autosampler

C.4 Cara Kerja

Timbang dengan ketelitian 1 mg 10g -15 g con;oh ke dalam tabu 200 ml
 Tambah 50 ml etanol, 100 pyrogallol dan 20 ml larutan KOH jenuh
 Kocok atau aduk campuran tersebut di atas dengan kuat di bawah tekanan N_2 pada 25 $^{\circ}\text{C}$
 – 30 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit
 Pindahkan ke dalam labu kocok 500 ml dan dibilas dengan 150 ml air dan 150 ml dietil eter lalu kocok dengan kuat
 Ekstrak lapisan airnya dua kali dengan masing-masing 100 ml dietil eter
 Gabungkan dietil eter dan dicuci dengan 100 ml air sebanyak 3 kali.

CATATAN Air pencucinya harus betul-betul sampai netral

Tambah 5 g natrium sulfat dan larutan eter ke dalam water-repellent filter dan saring ke dalam labu berdasar bulat 250 ml
 Bilas tabu kocok dengan sedikit dietil eter
 Uapkan solven dengan rotary evaporator pada maks. 40 $^{\circ}\text{C}$ di bawah tekanan yang dikurangi (pompa uap air).
 Tambah residu tersebut dengan 10 ml metanol, biarkan pada 0 $^{\circ}\text{C}$ dan saring dengan vacuum mikro. Buang residu saringannya.
 Masukkan saringan ke dalam labu lancip 10 ml dan uapkan dengan rotary evaporator sampai kira-kira tersisa 1 ml
 Pindahkan ke dalam labu 2 ml dan impitkan dengan metanol.

CATATAN Jika terjadi kekeruhan yang menjadikan cepatnya pengendapan, gunakan larutan yang jernih untuk diinjeksikan ke HPLC.

C.5 Pemisahan bahan yang tidak tersabunkari dengan cara tehnik reversing phase.

Penetapan fraksi vitamin D

Timbang 50 mg vit. D ke dalam labu ukur 100 ml, larutan dalam metanol pada suhu kamar dan impitkan sampai garis tanda dengan metanol.

Encerkan +/- 100 ml larutan (a) ke dalam labu ukur 100 ml dan diimpitkan dengan metanol.

Kondisikan kolom RP 18 dengan pre-kolom menggunakan eluen I dan kecepatan alirnya 2 ml / menit sampai mendapatkan garis lurus yang stabil pada panjang gelombang 265 nm.

Alirkan 1000 ml larutan (b) ke dalam kolom RP 18 dan pre kolom yang sudah dikondisikan menggunakan eluen I dengan kecepatan alir 2 ml/menit.

Tetapkan waktu retensi dari awal sampai akhir dari aliran vitamin D. Tentukan waktu antara permulaan aliran "- 1 menit" dan akhir aliran "+ menit" sebagai fraksi window.

C.6 Recovery fraksi vitamin D

- Injek 1000 ml larutan (e) ke dalam kolom RP 18 dengan pre kolom yang sudah dikondisikan dan alirkan eluen I dengan kecepatan alir 2 ml / menit.
- Kumpulkan fraksi vit. D (C.5e) yang dialirkan di antara fraksi window dalam labu lancip 10 ml.

CATATAN Fraksi vit. D yang dikumpulkan harus melewati detector ultra violet, ini dapat diperoleh dengan menghalangi penutup atau klep corresponding pilot.

- Uapkan fraksi (b) dengan sempurna di bawah tekanan yang dikurangi dalam rotary evaporator pada maksimum 40 °C.
- Larutkan residu dengan kira-kira 1 ml eluen 2 dan dinding tabu dibilas dengan hati-hati.
- Pindahkan larutan dengan ada sebagian yang mengandung partikel padat dalam 1000 ml syringe dengan dipasang penyaring mikro yang berpori-pori 0,45. Gunakan larutan saringan tersebut untuk penetapan secara kuantitatif (butir C. 8a). Masukkan larutan saringan di atas ke dalam labu ukur 2 ml dan irnpitkan dengan eluen 2. Gunakan larutan ini setiap kali sebanyak 200 ml.

C.7 Membuat grafik kalibrasi

- Timbang dengan ketelitian 1 mg, 100 mg vit. D ke dalam labu ukur 100 ml dan larutkan dengan eluen 2. Impitkan sampai garis tanda dengan eluen 2.
- Pipet 5 ml larutan a ke dalam tabu ukur 100 ml dan impitkan dengan eluen 2 sampai garis tanda.
- Pipet 5 ml larutan b ke dalam labu ukur 100 ml dan impitkan dengan eluen 2.

- d. Injek sebanyak 10 µl isampai 100 µl larutan c untuk membuat grafik kalibrasi ke dalam alat HPLC.

CATATAN 10 ul larutan c mengandung 25 mg vit. D.

- e. Alirkan larutan c ke dalam fraksi kolom dengan eluen 2 pada kecepatan alir 1,2 ml / menit. Deteksi ultra violet pada 265 nm.
- f. Plot grafik kalibrasi dengan menggambarkan tanda-tanda waktu detektor sebagai jumlah vitamin D yang diinjeksikan.

C.8 Penetapan vitamin D secara kuantitatif dan kualitatif

- a. Gunakan fraksi yang diperoleh pada (C.6c) untuk penetapan vitamin D. Untuk injeksi pada saat pengujian awal, pilihlah volume yang penetapan vitamin D secara kuantitatif dapat dilakukan sesuai grafik kalibrasi.
- b. Pemisah kondisi-kondisi fraksi vitamin D kerjakan seperti C.7e.

C.9 Perhitungan

- a. Penetapan kualitatif
Bandingkan waktu retensi khromatografi yang diperoleh sesuai C.8b dengan yang ditetapkan pada waktu plot grafik kalibrasi untuk vit. D dan indentifikasi vit. D dalam khromatogram.
- b. Penetapan kuantitatif
Kandungan vitamin D (M), dihitung dalam unit per 100 gram margarin, di mana satu unit vitamin D. Sesuai dengan 25 mg vitamin D dengan rumus :

$$M = \frac{Ml.100.V1.V2}{Mo.F. V2. V4}$$

dengan pengertian :

Mo adalah bobot contoh dalam gram;

Ml adalah bobot vitamin D yang di dapat dari grafik kalibrasi dalam monogram;

V1 adalah volume larutan contoh yang diukur (butir 4a) untuk pemisahan RP-phase dalam mikroliter;

V2 adalah volume yang diinjeksikan urtuk pemisah RP-phase (butir 6a) dalam mikroliter;

V3 adalah volume larutan contoh yang diukur untuk khomatografi (butir C.8a) dalarn mikroliter;

V4 adalah volume larutan contoh (yang diukur) yang pada khomatografi (butir C.8a);

F adalah Faktor konversi dari monograms vitamin D ke dalam units 25;

Jika ada keragu-raguan plot vitamin D pada fraksi vitamin D yang diperoleh sesuai butir C.6c dan khromatografi berikutnya di bawah ini kondisi yang dijelaskan pada butir C.6b

CATATAN Untuk penetapan vitamin D khromatogram yang diperoleh secara rutin untuk margarin yang diketahui dapat digunakan sebagai acuan.













BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id